台灣文心蘭種苗病毒驗證制度之建立與展望

張清安[1,3] 李紅曦[2] 陳金枝[1] 林玫珠[1] 王昭萍[1]

1 台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業試驗所 植物病理組
2 台北市 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 防疫組
3 聯絡作者：電子郵件 cachang@wufeng.tari.gov.tw，傳真：+886-4-23331089
接受日期：中華民國91 年12 月11 日

摘 要

張清安、李紅曦、陳金枝、林玫珠、王昭萍. 2003. 台灣文心蘭種苗病毒驗證制度之研擬與展望. 植病會刊12:141-148.

文心蘭 (*Oncidium* spp.) 乃我國近年全力發展之花卉產業，由於有利之氣候條件與進步之栽培管理技術，文心蘭切花之品質已獲得國際之認同，特別深獲日本市場消費者之喜愛。文心蘭之栽培雖較其他蘭花粗放，但管理過程中仍然會受某些特定病蟲害之侵襲而遭致損失。常見之病害包括病毒病、細菌性軟腐病及疫病等，其中病毒病之感染由於無法治療，因此特別受到關切。加上現階段文心蘭種苗之繁殖乃以無性分芽或組織培養方式爲主，若親本已感染病毒，則所繁殖之後代種苗將會全數帶毒，因而擴大蔓延之速度與影響之層面。截至目前有齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)、蕙蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*, CyMV) 、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 及番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) 等四種病毒曾經被發現可以感染文心蘭，其中以前二者分佈最普遍，對產業之影響最顯著。單獨感染ORSV 之文心蘭多數品種均不產生明顯病徵，只有少數品種會出現輕微嵌紋徵狀。感染CyMV 之文心蘭葉背會產生斷續深褐色壞疽型條斑。此二病毒均只能藉由機械傷口方式傳染，尚未發現可傳播之媒介昆蟲。二者若發生複合感染，則會造成嚴重嵌紋與萎縮之病徵，植株生育異常，嚴重影響切花之產量與品質。研究顯示由已感染病毒之親本進行分生組織繁殖乃造成近年來我國文心蘭病毒病趨於普遍之主要原因。本研究室根據文心蘭病毒可能之感染途徑，已規劃出符合現行產業界所適用，而且能避免病毒傳播之種苗生產流程，並設計病毒偵測之監控點，以保證各繁殖階段之種苗能免於病毒之感染。晚近動植物防疫檢疫局更將病毒檢查與此繁殖流程加以結合，建立國內首創之種苗病毒驗證制度，於 2003 年 3 月12 日公告實施。希望此起源並因而造就荷蘭成爲國際花卉王國之種苗驗證制度能輔導我國業者產出合乎國際標準之種苗，進一步提升我國文心蘭產業之競爭力。

關鍵詞：文心蘭、蘭花、病毒病、種苗、驗證

緒 言

蘭花產業是我國花卉生產中極重要之一環，其中蝴蝶蘭之輸出量更已名列國際前茅，而文心蘭 (*Oncidium* spp.) 也被國內業者視爲另一項極適合我國發展之花種 (2,3)。近年來在業者的積極投入下，已成功開拓外銷市場，尤其文心蘭之切花品質更獲得日本市場之肯定 (2)。值得一提的是，近年來業者在品種收集與育種技術上更已獲得突破，打破文心蘭長久以來給人品種過於單一之呆板印象，除原有之切花品種Gower Ramsey 外，已推出多種盆花用品種上市 (13)，並逐漸打開國內外銷路。在目前各方對此產業發展一片看好，充滿期待之際，其實緬懷過去國內文心蘭產業之發展歷程，產官學各方均曾投注相當心力 (3,4,6)，過程中確實曾歷經不少艱鉅考驗，甚至蒙受可觀之經濟損失，不過也就在各方持續不懈化失敗爲經驗下，終能克服萬難而達到現在榮景。在可預期的未來，我國文心蘭產業仍將面臨不斷的考驗，有待各方持續之努力。但如何綜合過去發展歷程中之挫折與經驗，將其轉化落實於產業界日常之作業流程，以免重蹈覆轍，更是極端重要之工作。本文將特別就過去十數年來文心蘭產業在種苗生產上所歷經之演變，研究人員之因應對策，直至目前所推動之種苗驗證制度，依序說明，希望能藉此翔實記錄我國文心蘭種苗生產之演變，供各方參考。

我國文心蘭產業之發展

國內蘭界引進文心蘭之確實年代已不可考，初期以趣味性栽培爲主，爾後於1986年首次由泰國引進切花專用品系(cv. Gower Ramsey)進行試種[2]，由於品質不錯，加上適逢國內經濟起飛，對觀賞花卉之需求大幅成長，因而促成文心蘭切花產業之萌芽與後續之蓬勃發展。據估計1991年全台文心蘭栽培面積約僅10公頃，1996年增至88公頃，到了2001年已達到185公頃[2]。除了供應國內消費外，產業界於1992年開始試銷文心蘭切花至日本市場，當時只輸出3000支，到了1996年已增至2,456千支，約佔當年日本文心蘭進口量之14.7%，1999年之統計我國輸日文心蘭總數達到11,430千支。佔日本全年進口量之56.7%，超過新加坡、泰國、馬來西亞及其他國家之總和，爲日本全年文心蘭消費量之三分之一[2,3]。

我國文心蘭種苗繁殖之演變

初期種苗多購自泰國之分生組培苗，由於栽培成績亮麗，引起各方注意而紛紛跟進。部份業者爲求時效，捨棄分生瓶苗而直接由泰國或日本引進成株種植[2,3]。筆者當時曾經參與檢疫監測工作，發現其病毒感染率有偏高之現象(未發表資料)。此類種苗經農民栽植一段時間後，因例行之剪花過程中所造成之傷口傳染，常使全園植株於一兩年後全面發病，而影響植株生長勢與切花之產量與品質，當時業者因而損失不貲者大有人在[2,6]。經此教訓後國內業者便逐漸放棄泰國管道，改由國內購買組培苗，或自行選出園藝性狀優異之個體後，委託國內組織培養業者代工生產種苗[3]。然而此種方式雖稍有減輕文心蘭種苗病毒病發生率，而延緩切花之生產年限，但由於未將病毒篩檢之觀念全面落實於產業界，因此病毒問題並未獲得根本解決。民國85年農林廳所舉辦的文心蘭外銷產業規劃會議中，與會農民一致決議，促請政府迅速規劃建立文心蘭健康種苗生產與供應體系，凸顯業者對健康文心蘭種苗之穩定供應有殷切之期盼[2]。

本研究室過去參與蘭花病毒病之研究，並透過農林廳推廣管道服務蘭界多年[4,7]。民國八十七年農委會有鑑於病毒病對文心蘭之威脅，委託本研究室規劃適合本省產業現況之文心蘭健康種苗生產與供應體系[6]。初期企圖由政府研究推廣單位篩選園藝性狀優良之品系單株，集中保存於試驗單位之隔離網室內，再透過病毒檢定篩選出無病毒植株，供爲大量分生組培之親本，繁殖種苗後提供業者種植。但此構想鑑於所需之成本與人力均非專責試驗研究之單位所能承擔，故改由農民自行篩選適合品系單株，經過病毒檢定篩選，通過篩選確定無病毒感染之親本再轉交專業代工組培廠商進行種苗分生繁殖[6]。

過程中本研究室爲確實掌握病毒感染對文心蘭生長之影響，曾經刻意模擬將病毒分成三種不同感染組合接種於蘭西品種植株，然後進行分生繁殖，再比較不同感染組合之種苗在組織培養瓶內與出瓶定植後與無病毒感染對照種苗間生長速度之差異[6]。結果證實在組培期間無病毒瓶苗之株高即已顯著高於感病瓶苗(表一)，在四個月之調查期間內，無病毒瓶苗之平均高度超越感染病毒者達1公分以上(表一)。對組織培養苗而言，此種差異已經具有顯著之經濟意義。根據當時一位協助本計畫之組培廠商之評估，如以15萬株(5000瓶)瓶苗爲生產目標時，依廠商之慣例預估約需2年方能完成交貨。但經由病毒篩檢之親本在相同之繁殖流程下卻只要1年3個月即可達成，二者間相差

表一、無病毒與感染病毒之蘭西文心蘭分生組織培養苗於培養瓶內與出瓶定植後之生長差異

Table 1. Effects of virus infection on the growth of mericloned oncidium seedlings during tissue culture stage and after transplanting in pots

Characters	Tissue culture staged seedlings [1]				Transplanted seedlings [2]			
	VF	ORSV	CyMV	O+C	VF	ORSV	CyMV	O+C
Plant height (cm)	9.3	7.5	8.0	8.2	33.5	33.4	29.0	21.0
Leaf width (cm)	0.8	0.7	0.6	0.8	3.1	2.2	2.7	1.8
Leaf length (cm)	- [3]	-	-	-	29.3	22.5	25.8	15.4
No. of buds	-	-	-	-	3.5	3.4	3.3	3.1

1. Plants of Oncidium var. Gower Ramsey were divided into four groups for inoculation treatment with ORSV, CyMV, ORSV mixed with CyMV (O+C), and mock (VF), respectively. After confirming the infection by ELISA tests, each group of plant were subjected for meristem tissue culture cloning. Stage I mericloning was done by Tai-Da orchid nursery, whereas propagation of the subsequent stages were conducted in our laboratory. Seedlings of stage II about 3-4 cm in height were selected and transferred into stage III flasks. Twenty-five seedlings were planted in each flask. Measurements of plant height and leaf width of the stage III seedlings were conducted every month until 5 months after transplanting. Five flasks and four seedlings from each flask were randomly selected from each inoculation treatment for measurement. Only the data of 4 months after transplanting was shown in this table.

2. Aforementioned stage III tissue culture seedlings from each inoculation treatment were removed from flasks and transplanted into pots when they were about 8 cm in height. About 300 seedlings from each inoculation treatment were planted together for observation. Every 6 months after transplanting, 20 seedlings were randomly selected from each treatment for measurement of plant height, leaf width, leaf length and bud number. The data shown in this table are averages of measurement taken 18 month after transplanting.

可達 9 個月，顯示繁殖經檢定確定無病毒感染之文心蘭對組培廠商而言具有顯著之經濟意義。爾後本研究室進一步調查上述不同感染組合之種苗在出瓶定植後之生長狀況並與無病毒種苗比較，經過 18 個月之觀察，結果證實無病毒種苗在葉長、葉寬、株高及分芽數等四個調查指標上均優於感染病毒之組合，甚至與二病毒複合感染者達到近一倍之差異 (表一)。此二項試驗充分證明病毒感染對文心蘭組培苗在組培期間之生長速度有明顯之抑制，對於種苗出瓶定植後之生長也有明顯之影響 [6]。此項結果充分凸顯病毒篩檢在文心蘭種苗生產上之必要性。

文心蘭種苗驗證制度之研擬與實施

協助文心蘭業者篩檢病毒之計畫在農委會支持下實施二年，其效果逐漸獲得組織培養業者與文心蘭栽培者之肯定，估計國內文心蘭在民國 87 年以後，受病毒病之威脅已逐漸減輕。但執行此計畫之過程中亦發現少數個案，親本雖經篩檢確定並未感染病毒，但經廠商分生繁殖後，部份種苗仍發現有被病毒感染之情況。後經本研究室追蹤探討發現，此情形乃源自樣品送交病毒檢定過程中出現感染空窗期而發生漏檢現象，另外在委託組培廠商繁殖之過程中亦有發生污染之情況。基於各種可能感染源之確認，本研究室於 89 年提出一套完整之無病毒種苗生產流程 [8,10]，此流程涵蓋不同病毒檢查技術之運用與監控點之設計，希望能保證所生產之文心蘭種苗能符合國際標準，確實避免病毒之感染，以提升產業之競爭力。2001 年動植物防疫檢疫局為輔導國內種苗產業，訂定輔導性之種苗驗證辦法，將文心蘭列為首要推動之對象作物，希能仿效荷蘭種苗業，引進其無病原感染驗證之觀念與作法 [9,20]，協助業者建立統一之種苗健康管理標準，以鼓勵代替懲罰，讓合於標準之種苗獲得客觀之驗證，提升品質形象與競爭力，進而對未能符合統一標準之業者施以淘汰之壓力，促使其提升種苗健康管理之意願。此驗證制度於 2002 年 3 月 12 日正式由防檢局公告實施 [1]，為國內非強制性種苗驗證制度之首例。

感染文心蘭之病毒種類與特性

截至目前有齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)、蕙蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*, CyMV)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 及番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) 等四種病毒曾經被發現可以感染文心蘭 [6,7]。此四種病毒雖然都有感染文心蘭之記錄，但是分佈最廣對產業最具威脅性的仍屬 ORSV 與 CyMV [7,22,25]，此二病毒除文心蘭外還可以感染 20 種以上之蘭花種類，對整個蘭花產業而言最具危險性 [22,25]。以下將就各病毒對文心蘭所造成之病徵與傳染方式及病毒特性分別敘述。

一、齒舌蘭輪斑病毒 (ORSV)

1. 病徵

對於我國現階段栽培最廣的切花用蘭西 (Gower Ramsey) 品種而言，單獨感染 ORSV 時經常不會表現明顯病徵，但在火山皇后 (volcano queen) 或哈瓦那 (avana) 品種上則會於葉片產生深綠色條紋或不規則形斑塊 [10]。感染 ORSV 對植株之生長勢影響並不明顯，若沒有無病毒感染之植株作為對照，不易察覺其差異，由於此種病徵不明顯之特性，容易使栽培者忽視其存在，在經由機械性傷口傳染而逐漸蔓延，此可能是 ORSV 普遍分佈之主因 [10,16,23]。目前尚無證據顯示 ORSV 會在文心蘭花部造成病徵。不過根據筆者之試驗，單獨感染 ORSV 之文心蘭在組織培養過程中，幼苗生長之速度的確明顯遜於無病毒植株 (表一)。事實上 ORSV 對於文心蘭之危險性在於若與 CyMV 發生複合感染時，不僅會在葉部造成明顯嵌紋病徵 [10]，且對植株生育有嚴重影響 [10]。

2. 病毒特性與傳播方式

ORSV 乃煙草嵌紋病毒屬 (*Tobamovirus*) 之一種 [16,23]。顆粒型態為短硬桿狀，長度為 300 nm [23]。此病毒屬的共通特性即性質極為穩定，在寄主細胞外耐熱性可以高達 95℃ 且可存活相當時日 [16,23]。根據日籍學者之報告，此病毒在 20℃ 下細胞外可存活至少 10 年之久 [21]。截至目前尚未證實 ORSV 可被任何媒介昆蟲傳播，而只能藉由機械性傷口入侵，因此在繁殖與栽培文心蘭之過程中，所有可能造成表面傷口之機會都是病毒傳播之途徑，包括在組織培養中之傳接動作所造成之細微傷口均可能傳播此病毒，當然栽培過程中所有藉由工具之操作如修剪、切花甚至植株葉片間之摩擦都是傳播之機會 [22,25]。雖然沒有任何報告證實 ORSV 有專一性媒介昆蟲，但是栽培過程中所有可能在文心蘭植株上造成機械性損傷之昆蟲或小動物如蟑螂、蝸牛等亦有傳播 ORSV 之可能。

二、蕙蘭嵌紋病毒 (CyMV)

1. 病徵

CyMV 單獨感染 Gower Ramsey 文心蘭的情形與 ORSV 相同也不會出現明顯病徵，這種情況尤其在開花前之植株特別明顯，但開花後或老化植株則有出現病徵之傾向。常見之病徵為葉背產生斷斷續續深褐色壞疽型條斑，長度約在 0.5 - 1 公分左右 [10]，條斑部位稍有凹陷，由於此種條斑只發生在葉背，因此常被栽培者忽視甚至誤認為真菌感染所致。CyMV 與 ORSV 一樣不會在文心蘭花部造成病徵，但是對組織培養中之幼苗之生長速度確有明顯之抑制 (表一)。CyMV 與 ORSV 複合感染文心蘭後，葉部會出現明顯嵌紋、黃化條紋或黃化嵌紋病徵 [10]，葉幅與葉長均明顯縮小，植株生育受到抑制，但分芽數反而較正常植株增多 [10]，不過每一芽體因為競爭營養之結果，全部較

被感染前縮小，所抽生之花梗長度減短，分叉數亦減少，爾後隨病勢之進展植株之生育更形緩慢，對肥料之反應遲鈍，花梗之數量與品質亦日漸低落 [10]。根據免疫分析結果，在複合感染之植株體內不論ORSV或CyMV之濃度均遠較單獨感染之植株中增加許多，因此此種植株之傳染性遠高於單獨感染之植株，而一個蘭園中若複合感染之植株愈多，則病毒之傳播速度就愈快，導致蘭園逐漸喪失生產價值。

2. 病毒特性與傳播方式

CyMV 乃馬鈴薯 X 病毒屬 (*Potexvirus*) 之成員 [14]，此屬病毒之細胞外穩定性雖不如 *Tobamovirus* 般的頑強，但也是細胞外性質極為穩定之一屬。其顆粒型態為稍可彎曲之桿狀，長度為 450 nm 左右 [14,18]。細胞外耐熱度為 60 - 70℃ [18]，而室溫下耐保存性為 25 天 [18]。目前也尚未發現可以傳播 CyMV 之媒介昆蟲，其傳染方式與ORSV完全相同，均藉由機械性傷口傳播 [14,18]。

三、番茄斑萎病毒 (TSWV)

1. 病徵

根據夏威夷大學學者之報告，根據免疫抗血清檢查結果發現文心蘭植株受到TSWV感染，病徵為黃化同心圓輪斑 [19]。不過此病害後來並未在當地擴散蔓延，可能該TSWV系統對文心蘭之病原性或傳染性並不強，只是在偶然之情況下侵入而已 [19]。事實上筆者也未曾在台灣發現或接到農友報告有類似病徵之文心蘭植株出現，因此目前雖有TSWV感染文心蘭之記錄，但評估其對文心蘭之威脅性應低於ORSV與CyMV。

2. 病毒特性與傳播方式

TSWV 乃番茄斑萎病毒屬 (*Tospovirus*) 之一種 [17]，病毒型態為表面有附膜 (enveloped) 之球形顆粒，直徑約為 85 nm [17]，此屬病毒之細胞外性質極不穩定，細胞外耐熱度為 45℃，室溫下耐保存性僅有 5 小時 [17]，雖然部分病毒系統可以機械摩擦方式接種，但大部分系統之機械接種成功率不高，在田間仍主要藉薊馬 (thrips) 以永續型方式媒介傳播 [17]。根據Hawaii的報告，可傳播TSWV的薊馬種類 *Frankliniella occidentalis* Pergande 在Hawaii分佈極為普遍 [19]，然而此薊馬至今尚未在台灣立足，因此只要做好檢疫把關，TSWV不致於對國內文心蘭造成威脅。因此目前防檢局所推行之文心蘭病毒驗證制度尚未將此病毒列為例行篩檢對象。

四、胡瓜嵌紋病毒 (CMV)

1. 病徵

事實上文獻中還沒有CMV感染文心蘭之正式紀錄，不過筆者曾於數年前在農民送來檢驗之標本中，以免疫檢定法檢查到一株受CMV感染之文心蘭 (未發表資料)，當時的標本葉片呈現不明顯之斑紋病徵，約略可見與葉脈平行之黃色條紋，該植株大小與一般正常植株無異，由於尚未開花，故其對花部有否影響不得而知。另外最近筆者又在一批農民送驗之文心蘭親本中發現與CMV抗血清產生正反應之樣品，這些樣品利用RT-PCR又與CMV之專一性引子對反應，增幅出符合預期大小之DNA片段，證實這些樣品的確受到CMV之感染 (未發表資料)。但由外觀上仍察覺不出有任何異常之徵狀。由於CMV乃經由蚜蟲媒介傳播，而國內文心蘭多數栽培於僅有遮陰網之開放環境下，因此推論CMV是有機會在文心蘭園內廣泛發生，倘若感病植株被篩選為繁殖用親本，則後代種苗有可能全面感染CMV。因此未來國內執行文心蘭種苗之病毒驗證時，亦應將CMV列為檢定對象以避免其蔓延極可能之危害。所幸防檢局於2003年所推出之驗證作業程序中，已將CMV列為檢定對象病毒 [1]，業者若能遵循此驗證制度之作業流程，則其種苗應可避免CMV之威脅。

2. 病毒特性與傳播方式

CMV 為 *Cucumovirus* 屬之一種 [24]，乃球形顆粒體，直徑 28 nm [24]。此病毒寄主範圍極為廣泛，可以感染85科365屬高達800種以上的植物 [24]。本省為數極多之重要經濟作物均有CMV感染之記錄，因此其族群在田間之分佈極為普遍。此病毒可以經由機械摩擦傷口傳染，但田間主要經由蚜蟲以非永續型方式媒介傳播 [24]，而可以傳播CMV之蚜蟲種類為數頗多，這也是此病毒族群廣泛分佈之主要原因。

文心蘭種苗生產過程中病毒來源與感染途徑

規劃不同作物之無病毒種苗生產體系必須考量各作物之生長特性與可能感染之病毒種類，另外產業環境也是重要的影響因素 [5]。無病毒種苗生產體系對我國文心蘭業者而言，雖屬於革新之作法，但也必須能融入現行文心蘭產業中之種苗產銷流程與慣例，才能為業界普遍接受，否則硬將一套適合國外或其他作物之種苗生產體系要求國內業者大幅改變現狀加以接受，可能難以成功。因此本研究室在規劃無病毒文心蘭種苗生產流程前，曾實際調查瞭解國內文心蘭之產業現況，發掘可能之病毒來源與感染種苗之途徑，作為規劃之依據。結果發現近年來國內文心蘭種苗感染病毒之途徑有如下幾個可能：

一、繁殖用親本植株已感染病毒，未經病毒檢定即進行分生組培，繁殖之結果造成種苗全面帶毒。

台灣自從停止向泰國進口文心蘭成苗或組培苗，而自行生產分生苗後，早期業者在篩選出優良性狀之親本後，通常未檢視病毒感染情形，即直接進行分生組培，因此造成種苗普遍感染病毒。

二、處於空窗期感染之繁殖用親本，因病毒濃度低，而未檢出病毒，分生組培之結果造成種苗全面帶毒。

數年前農林廳及農委會開始補助推廣蘭花病毒檢查服務[4]，部分文心蘭業者利用此服務系統，將篩選之優良親本送請病毒檢驗，但當時服務單位通常只根據一次病毒檢定之結果，即判定病毒感染狀況，若遇到處於感染空窗期之植株，因病毒尚未繁殖至可檢出之濃度，常會有漏檢之情形發生，而導致組培繁殖後，仍有部份種苗帶毒之情形發生。

三、繁殖用親本並未感染病毒，但在組織培養過程中，F遭到病毒污染。若分生苗在母瓶期即被病毒污染，則後續所繁殖之種苗會全面帶毒，若在子瓶期才被污染則可能只有部分子瓶之種苗感染病毒。根據筆者之調查，國內文心蘭栽培者多數委由專業之組織培養代工廠商生產分生苗，有些業者在操作過程中所慣用之流程與技巧無法完全避免病毒污染，導致不同批號之蘭花材料間發生相互傳染。可能造成病毒傳染之組織培養操作方式包括：

1. 不正確之工具消毒方式：

組織培養所使用之操作工具如鑷子、解剖刀等均需經過滅菌程序才能避免菌類包括霉菌與細菌之污染，因此組培業者就根據自己之習慣，設計不同之滅菌方法，傳統上絕大多數國內外業者均使用高溫滅菌法，例如利用高溫烘箱(oven)之乾熱滅菌法、高壓殺菌鍋(autoclave)之濕熱滅菌法及無菌操作台(laminar flow stage)上使用之火焰消毒法。但國內有部分業者基於使用上之效率與成本考量，捨棄傳統火焰消毒，而改用次氯酸鈉溶液(漂白水)進行滅菌。次氯酸鈉溶液除了有揮發性氯氣可能影響操作人員之健康外，其滅除病毒之效果並未獲得證實。國內部分組培業者爲了提升生產效率與降低成本，而大量使用次氯酸鈉溶液在無菌操作台上之工具消毒，雖然其滅菌效果仍可被接受，但也成爲近年來國內蘭花組織培養苗發生病毒感染之可能原因。加上危害蘭花之二大主要病毒，ORSV 與 CyMV 均爲細胞外性質極爲穩定之病毒，其中 ORSV 甚至在寄主細胞外可以存活 10 年以上[21]，因此若缺乏適當有效之滅除方法，此病毒極有可能長期存留污染無菌操作台台面或工具，甚至操作人員之手部及衣物，自然有機會感染藉由此無菌操作台所傳接之組培苗。

2. 傳接操作盤之污染：

組織培養過程中爲避免菌類污染，除利用無菌操作台進行組培苗之傳接外，在操作之過程中也大都會應用操作盤或支撐物，來隔絕組培苗與台面之直接接觸，以避免不同批號材料間之污染。嚴格說來，操作盤必須隨不同批號(來源)種苗更換，否則上一批材料若感染病毒，則可能污染操作盤表面而感染下一批種苗。若因人員疏忽而忘記更換操作盤，或者所使用之操作盤之材質與結構有滲漏或溢出植物汁液之可能時，都是導致組培苗遭到病毒感染之原因。

3. 操作人員之疏忽與不良習慣：

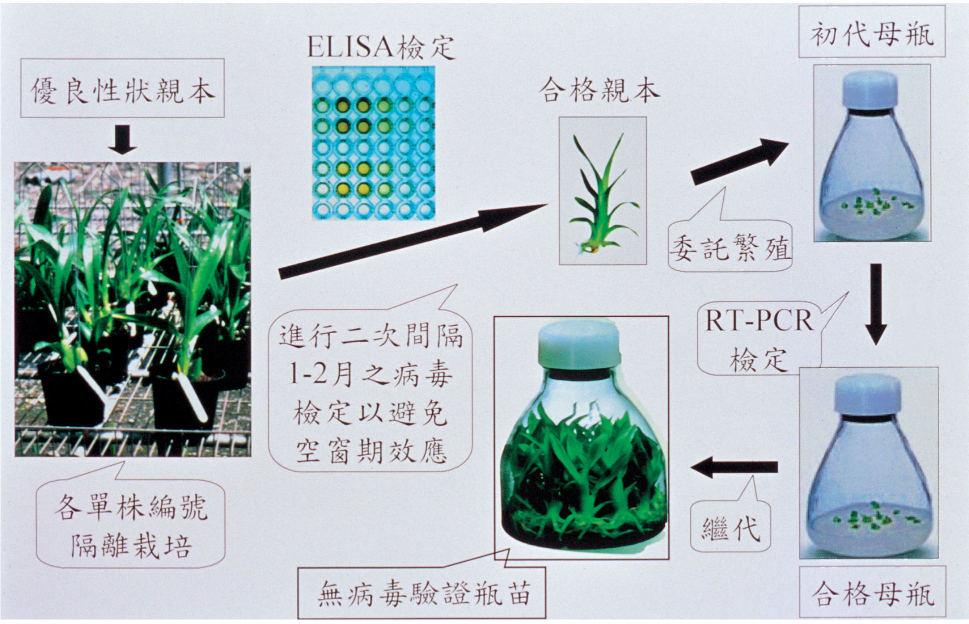
組培操作人員之素質與習慣，可能影響組培苗之帶病毒比率。例如該換操作盤而不換，火焰消毒工具時草率而不完全。這些錯誤是蘭花組培苗難以避免病毒感染之關鍵因素。因此組培業者如何訓練員工，培養其敬業精神，加強品質監控，乃降低病毒污染比率，提昇產品品質與競爭力之不二原則。

四、組培苗並未感染病毒，但是在移出瓶外定植之過程中遭到病毒感染。根據筆者之調查，縱使分生苗爲無病毒感染者，若業者在後續移瓶定植之過程中未能嚴格採取預防病毒感染之措施，仍然會有種苗感染病毒之情況發生。業者常犯之錯誤包括：

1. 部分業者習慣將組培苗由瓶內移出後，置於容器內洗滌殘餘培養基或以保護性藥劑處理，此時若使用同一容器處理不同批號之種苗，而有些批號之種苗爲帶毒者，則殘餘病毒會污染容器表面，導致在處理下一批種苗時發生病毒感染。其實若同一批種苗內有部分個體爲病毒感染者，當所有種苗放在同一容器內處理，也會造成其他個體遭受感染。
2. 進行種苗定植操作所使用之工作台台面、工具與人員手部均有可能在移植的過程中接觸到帶病毒之種苗而遭到病毒之污染，進而成爲傳播病毒之媒介。

文心蘭無病毒種苗生產流程與驗證制度

根據上述文心蘭種苗生產過程中感染病毒之可能途徑，本研究室仿效荷蘭實施無病毒植物種苗驗證之作法，規劃出符合國內文心蘭產業現況，避免病毒感染之健康種苗生產流程，並於流程中設計檢查監控點，透過檢查人員之現場研判、輔導及採樣，以符合國際學術水平之病毒偵測技術[11,12,15]，由專責之中央實驗室進行病毒檢定，以驗證所生產之種苗之病毒感染情況(圖一)，符合無病毒感染標準之種苗則由防檢局授與具有一定效期之證書(Certificates)。此項驗證制度已於 2002 年 3 月 12 日正式由防檢局公告實施[1]，本制度之運作由種苗改良繁殖場擔任受理機關，負責接受業者申請，並於驗證通過後代表防檢局簽發驗證證書。另由農業試驗所擔任病毒檢定機關，由種苗改良繁殖場、台中區及台南區農業改良場擔任檢查機關。受理機關於接受業者申請後即通知檢查機關指派檢查人員前往申請驗證之業者園圃，檢查其設施與管理操作是否合乎避免病毒傳播之規定，並負責採取樣品送交檢定機關進行病毒檢定。檢查人員之訓練由農試所負責，通過訓練之人員由防檢局授與本驗證制度之正式檢查員(Inspector)證書。整個驗證制度之作業流程摘述如下，詳細驗證作業規範與標準可參考防檢局於 2003 年 3 月 12 日



圖一、台灣文心蘭無病毒種苗繁殖與驗證流程圖。

Fig. 1. Flowchart of virus-free oncidium seedling propagation and certification program in Taiwan.

正式公告之『文心蘭無病毒種苗驗證作業須知』[1]：

一、有意申請文心蘭種苗驗證之業者可填具申請書註明所申請之文心蘭種苗種類 (組培瓶苗或定植苗)，品種及親本數量與擬生產之種苗總數等資料，向種苗場提出申請。

二、申請人需將文心蘭親本單株栽培於可嚴格控制人員出入，並具有阻隔病毒傳播昆蟲及軟體動物入侵功能之隔離設施內，期間需避免任何人為接觸而造成傷口之機會，各單株予以獨立編號，並給予適當距離以避免植株間葉部摩擦接觸。培育過程中植株若需修剪或整理，使用之工具應經高溫消毒，並以單株單剪方式為之，以避免植株間之相互污染。

三、種苗場接受申請後通知轄區之檢查機關，遣派檢查員前往業者園圃，先檢查其親本保存園之設施與管理是否符合本驗證制度作業須知之要求，不符合者輔導業者改善，符合者方可進入正式驗證程序，由檢查人員就所申請驗證之親本進行採樣，送交農試所檢定中心進行病毒偵測。

四、檢定中心根據所送之葉片標本，針對 ORSV、CyMV 及 CMV 三種病毒，以免疫抗體連接酵素反應 (ELISA) 進行檢定，完成後立即通知申請人將確定感染之單株移出親本園淘汰，剩餘單株繼續隔離觀察，待下一支芽體長出 (約 1 - 2 個月) 後，再採取新芽之葉片，進行第二次病毒檢定。此乃為避免第一次檢查時適逢病毒感染空窗期而未能正確驗出病毒感染所設計，雖然需增加檢驗觀察時間，但有確保檢驗結果正確之優點。經二次檢定均未測出病毒感染之單株，即通知申請人准予進行分生組織培養。

五、申請人可自行或委請專業組培廠商進行分生繁殖，但組織培養場之設施與管理作業必須通過檢查員之檢查，符合驗證作業須知規定者[1]，方繼續進行後續之驗證檢查作業。不符規定且不願改善者，除非申請人更換合格組培廠商，否則驗證作業即行停止。

六、無病毒親本經分生組培繁殖至母瓶階段時，由檢查員自母瓶瓶苗中抽樣送交檢定機關以反轉錄聚合酶連鎖反應法 (RT-PCR) 進行病毒檢定，確定未感染 ORSV 及 CyMV 者方准予繼續進行繼代增殖。後續繼代增殖之子瓶瓶苗由檢查員依現場狀況研判，必要時亦得抽樣送檢定機關進行檢定。未檢測出病毒之母瓶瓶苗所增殖之子瓶瓶苗，經檢查員確認後視為符合規定之瓶苗，由種苗場核發無病毒文心蘭種苗證明書。驗證有效期限為三個月。

七、為配合部份業者以銷售文心蘭定植苗為主要業務，此驗證制度亦容許業者向防檢局申請定植苗驗證，但必須以定植苗來自驗證合格之組培瓶苗為限。由檢查員就業者定植時之操作程序是否合乎防止病毒傳染之原則進行現場驗證，必要時可抽樣送交農試所進行病毒偵測，合格者授與無病毒文心蘭定植苗之驗證，有效期限六個月。

結 語

我國文心蘭被視為未來僅次於蝴蝶蘭之重點產業，由過去十數年來產業發展之經驗，充分顯示病毒病可能造成之威脅。根據國際花卉先進國家之發展經驗，實施種苗病

毒驗證制度乃降低病毒病對產業衝擊之有效策略[9,20]。本研究室根據多年來對國內文心蘭種苗生產現況之觀察，已掌握病毒病感染之可能途徑，進而規劃出符合產業現實，而能避免病毒傳播之種苗生產流程，並設計病毒偵測之監控點，以確保各繁殖階段之種苗能免於病毒感染，動植物防疫檢疫局更將病毒檢查與此繁殖流程加以結合而成為文心蘭種苗病毒驗證制度[8,10]，於2003年3月12日將『植物種苗疫病蟲害驗證輔導要點』及『文心蘭無病毒種苗驗證作業須知』正式公告實施[1]，成為我國非強制性種苗驗證制度之首例。希望此一制度之實施能輔導文心蘭產業生產出合於國際先進國家品質標準之種苗，並經由客觀公正之驗證，於產業間建立公開公平公認之品質標準，藉以提昇我國文心蘭產業之高品質形象與競爭力。此項制度在荷蘭已經實施長達半個世紀以上，無疑的是奠定荷蘭種苗品牌形象與超強競爭力之一項關鍵因素[9,20]，但對於國內推動多年之健康種苗生產而言卻是首創之制度，筆者相信若能堅持此既定方向，排除未來需面對之可能挑戰，勢必對我國文心蘭甚至其他種苗產業產生深遠影響，有朝一日使台灣蘭花成為國際認可之優良品牌，產業競爭力之提升與永續發展，方能水到渠成。

謝　辭

本研究多年來承農委會、農林廳及防檢局之經費補助方能順利完成，謹此致謝。研究初期蒙涂振鑫先生多方幫忙及提供寶貴意見，國內蘭界先進賴本智、張文賢及賴信嘉先生等均曾大力協助，在此一併表達由衷謝忱。

引用文獻

1. 動植物防疫檢疫局. 2002. 文心蘭無病毒種苗驗證作業須知. P.248-256. 文心蘭專刊. 孫慧慈等編輯. 台灣區花卉發展協會 出版. 269 pp。
2. 李仍亮. 2002. 台灣文心蘭之外銷現況與展望. P.2-9. 文心蘭專刊. 孫慧慈等編輯. 台灣區花卉發展協會 出版. 269 pp。
3. 周明燕. 2002. 文心蘭產業現況分析. P.10-20. 文心蘭專刊. 孫慧慈等編輯. 台灣區花卉發展協會 出版. 269 pp。
4. 涂振鑫. 1998. 蘭花病毒病檢定法之建立與推廣. 台灣農業 34:1-7。
5. 張清安. 1997. 本省應用無病毒種苗之回顧與展望. 植物保護學會刊 39:63-73。
6. 張清安. 2000. 植物病毒病害之防疫—應用健康種苗於文心蘭病毒病之防治. 興大農業 35:1-7。
7. 張清安. 2001. 植物保護技術專刊系列1-蘭花病毒病害. 張清安編著. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局出版，台北，台灣. 32 pp。
8. 張清安. 2001. 文心蘭無病毒種苗認證制度之研擬與展望. P.91-101. 健康種苗在植物病害防治上之應用研討會專刊. 中華民國植物病理學彙編印. 156 pp。
9. 張清安. 2002. 鬱金香條紋病毒之啓示. 科學發展 351:24-31。
10. 張清安. 2002. 文心蘭病毒病與健康種苗認證制度. P. 169-186. 文心蘭專刊. 孫慧慈等編輯. 台灣區花卉發展協會 出版. 269 pp。
11. 張清安、陳金枝、王昭萍. 1999. 一種專供文心蘭組織培養瓶苗檢定用之高效率反轉路聚合脢連鎖反應之研發. 植物病理學會刊 8:180。
12. 張清安、陳金枝、曾雅詩、鄧汀欽. 1999. 應用聚合酶連鎖反應及核酸探針雜配法偵測齒舌蘭輪斑病毒. 植物病理學會刊 8:29-36。
13. 賴本智. 2002. 文心蘭、蜘蛛蘭、堇花蘭、齒舌蘭及其近緣屬的種源介紹. P.86-133. 文心蘭專刊. 孫慧慈等編輯. 台灣區花卉發展協會 出版. 269 pp。
14. Brunt, A. A., Foster, G. D., Martelli, G. P., and Zavriev, S. K. 2000. Genus: *Potexvirus*. P.975-981. In: Virus taxonomy; Classification and nomenclature of viruses. Van Regenmortel, M. H. V. *et. al.* (eds.), Academic Press, San Diego, CA. 1162 pp.
15. Chang, C. A., and Pang, J. H. 1990. Preparation of antisera against cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus and their uses in serological indexing for orchid industry in Taiwan. Plant Prot. Bul. 32:336.
16. Edwardson J. R., and Zettler, F. W. 1988. Odontoglossum ringspot virus. P.233-247. In: The plant viruses. Vol. 2. Van Regenmortel, M.H.V., and Fraenkel-Conrat, H. (eds.), Plenum Publishing Corporation, New York, USA.
17. Elliott, R. M., Bouloy, M., Calisher, C. H., Goldbach, R., Moyer, J. T., Nichol, S. T., Pettersson, R., Plyusnin, A., and Schmaljohn, C. S. 2000. Genus: *Tospovirus*. P.617-621. In: Virus taxonomy; Classification and nomenclature of viruses. Van Regenmortel, M. H. V. *et. al.* (eds.), Academic Press, San Diego, CA. 1162 pp.
18. Hollings, M., and Stone, O. M. 1977. Cymbidium ringspot virus. CMI/AAB. Description of Plant Viruses, No. 178.
19. Hu, J. S., Ferreira, D., Wang, M., and Xu, M. Q. 1993. Detection of cymbidium mosaic virus, odontoglossum ringspot virus, tomato spotted wilt virus, and potyviruses infecting orchids in Hawaii. Plant Dis. 77:464-468.
20. Huttinga, H., and van Zaayen A. 2002. Naktuinbouw (Netherlands inspection service for horticulture). Acta. Hort. 568:111.
21. Inouye, N. 1983. Host range and properties of a strain of odontoglossum ringspot virus in Japan. Nogaku Kenkyu 60:53-67.
22. Lawson, R. G., and Hsu, H. T. 1995. Orchid viruses. p.

409-420. In: Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops. Loebenstein, G. et. al. (eds.), John Wiley & Sons, West Sussex, UK. 543 pp.
23. Paul, H. L. 1975. Odontoglossum ringspot virus. CMI/AAB. Description of Plant Viruses, No. 155.
24. Roossinck, M. J., Bujarski, J., Ding, S. W., Hajimorad, R., Hanada, K., Scott, S., and Tousignant, M. 2000. Genus: *Cucumovirus*. P.929-930. In: Virus taxonomy; Classification and nomenclature of viruses. Van Regenmortel, M. H. V. *et. al.* (eds.), Academic Press, San Diego, CA. 1162 pp.
25. Zettler, F. W., Ko, N. J., Wisler, G. C., Elliott, M. S., and Wong, S. M. 1990. Viruses of orchids and their control. Plant Dis. 74:621-625.

ABSTRACT

Chang, C. A. [1,3], Lee, H. H. [2], Chen, C. C. [1], Lin, M. J. [1], Wang, C. P. [1] 2003. Phytosanitary certification program of oncidium seedlings and its future prospect to the development of ornamental industry in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 12:141-148. ([1.] Dept. of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute; [2.] Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan; [3.] Corresponding author, Email: cachang@wufeng.tari.gov.tw, Fax:+886-4-23331089)

Oncidium orchid is considered a potential commodity in the ongoing development of ornamental industry in Taiwan. The quality of Taiwanese oncidium cut flowers is highly appraised in Japanese floral auction market. The number and acreage of oncidium orchid nurseries have increased in Taiwan during the last decade of the 20th century. Although oncidium industry has been developing prosperously, there are problems need to be solved. One of the concerns that affect most growers is the constant availability of high quality virus-free seedlings. In the past, tissue culture derived seedlings, the only propagation materials for oncidium orchids in Taiwan, were mainly imported from Thailand. However, many investigations have shown that those imported seedlings were frequently found with unacceptable virus infection rate. Nurseries growing these seedlings always suffered significantly from economical losses. Our growers, therefore, have increased their dependences on domestic tissue culture companies to supply oncidium seedlings. Virus diseases have become less problematic but still remain. There are four viruses, i.e. *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), *Cymbidium mosaic virus* (CyMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) known to infect oncidium orchids in the literature. In Taiwan and many orchid exporting countries, ORSV and CyMV are considered the most widely spread and economically important viruses. Besides infecting mother stocks, which are the major sources for virus dissemination, both ORSV and CyMV can easily contaminate orchid seedlings during tissue culture processing. This is because of their unusual in vitro stability. In order to produce high quality virus-free seedlings, we have developed an oncidium seedling propagation and certification program, in which on-site inspection and laboratory virus indexing are integrated to ensure phytosanitary production of oncidium tissue cultured seedlings. On March 12, 2002, the Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine (BAPHIQ) officially issued, for immediate implementation, the "Rules and Regulations for Certification of Virus-Free Oncidium Hybrids ". This is the very first phytosanitary certification program in the history of plant industry in Taiwan. Phytosanitary certification has been implemented for more than sixty years in the Netherlands resulting in strong international recognition of the Dutch floral industry. By enforcing the seedling certification program, we hope that the quality of Taiwanese oncidium seedlings will be improved and recognized and their international competitiveness will thus be increased.

Key words: Oncidium, orchids, virus disease, seedling, phytosanitary certification